

20020/27

厚生労働科学研究費補助金

特別研究事業

未承認医薬品及び健康食品による健康被害の
原因究明のための研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

(H14-特別-056)

主任研究者 奥田晴宏

平成15年3月

目 次

I. 総括研究報告書

未承認医薬品及び健康食品による健康被害の原因究明のための研究

奥田 晴宏 1

II. 分担研究報告書

1. N-フェンフルラミンの大量合成法の開発と検討

奥田 晴宏 6

2. 未承認医薬品及び健康食品の成分の分析、単離、構造決定並びに分析法の検討 合田 幸広

未承認医薬品及び健康食品の成分の分析、構造決定

合田 幸広12

毒性試験用 N-ニトロソ-フェンフルラミン大量分取に関する研究

川原 信夫23

未承認医薬品及び健康食品の分析法の検討

鎌倉 浩之31

3. N-ニトロソフェンフルラミンのラット 28 日間反復投与毒性試験

菅野 純37

III. 中国製ダイエット用健康食品（未承認医薬品）に関する調査結果の公表について

厚生労働省医薬局 監視指導・麻薬対策課58

平成 14 年度厚生労働科学研究（特別研究事業）
（総括研究報告書）

「未承認医薬品及び健康食品による健康被害の原因究明のための研究」

主任研究者 奥田晴宏 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部長

中国から輸入されたダイエットを目的とした複数の未承認医薬品及び健康食品により、全国で 800 名以上の健康被害が発生し、大きな社会問題となった。未承認医薬品による健康被害事例の多くは肝機能障害（約 61%）であり、次いで甲状腺障害（14%）であるが、障害事例のうち特に肝機能障害は重篤であり、4 名の死亡者が出ている。本研究は、この様な状況の下、国立医薬品食品衛生研究所の研究者を組織し、未承認医薬品等の健康被害の原因究明を行うことを目的としたものである。

研究内容は、健康被害を引き起こした各種未承認医薬品のプロファイル分析、未承認医薬品含有成分の単離と構造決定、未承認医薬品中の含有成分の定量、未承認医薬品の分析法の確立、未承認医薬品含有成分の調製法の検討と大量調製といった化学的研究及び、未承認医薬品含有成分の毒性試験といった、毒性的研究からなる。

健康被害の特に多い 3 製品「御芝堂減肥胶囊」、「紆之素胶囊」、「茶素減肥」の製品分析の結果、これらの製品に 3% 程度の N-nitroso-fenfluramine (NFF) が含まれていることが判明した。さらに、NFF 含量について、各製品のロットごとに分析を行った結果、NFF が肝機能障害の原因物質とすると、健康被害の発生状況と分析結果に矛盾が生じないことが明らかとなった。また、含有が確認された NFF 以外の物質の多くは日常的に食品から摂取される物質であり、肝機能障害の原因物質の可能性をもち、また含有が確認された他の医薬品成分（fenfluramine: FF、甲状腺素等）も、肝障害を引き起こすことは考えにくく、この点からも NFF が原因物質である可能性が高いものと推定された。また、別に「茶素減肥」より抽出、単離した NFF を持ちいて、投与量決定予備的な毒性実験を行ったところ、毒性実験には、少なくとも数 100 g の NFF が必要であることが判った。

以上の結果に基づき、NFF を被疑物質として、同物質の大量合成法の検討を行った。その結果、フェンフルラミンと亜硝酸ナトリウムとの反応で、安全に高純度な化合物が得られることが明らかとなった。そこで、大量合成を実施し、28 日間の毒性実験用の NFF 720g を合成し、ラット 5 グループに、体重 1kg 換算で、NFF 0mg、2mg、7mg、20mg、70mg をそれぞれ 28 日間投与した。また別に、ラット 2 グループに、体重 1kg 換算で、NFF 0mg、70mg をそれぞれ 28 日間投与し、その後、両グループ共、NFF を投与せず 14 日飼育した回復試験群を実施した。

毒性実験において、NFF は、一過性の神経症状と共に摂餌量の減少、体重増加抑制作用を示した。また、血清生化学検査における各種指標の推移を考慮し、同物質は、肝細胞性の障害のみならず、胆管系への障害の可能性も含む広義の肝障害を惹起するものと推察され、上記肝障害の原因物質である可能性が非常に高いことが明らかとなった。また、回復実験では、14 日間では、完全には回復に至っていないもの明白な回復傾向が見られた。なお、現在、引き続き行われている病理組織学的検査の結果により、NFF の毒性のより詳細な内容が明らかになるものと考えられる。

分担研究者 合田幸広（国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長）
所 生薬部長）、菅野 純（国立医薬品食品衛生研

A 研究目的

中国から輸入された、未承認医薬品等による健康被害の原因究明を行うことを目的とする。健康被害の多くは、肝機能障害と、甲状腺障害であるが、中でも肝臓障害は重篤である。健康障害が報告された未承認医薬品の中には、これまでに甲状腺末が含まれていることが報告された製品（せん之素こう囊）があり、含有する甲状腺末により、甲状腺障害が生じた可能性が示唆されるが、肝機能障害を生じる成分については、これまで全く報告がない。従って、肝機能障害の原因物質解明が本研究の最大の目的となる。

これまでの国立医薬品食品衛生研究所における分析データより、これらの未承認医薬品等のほとんどすべてから、N-nitroso-fenfluramine (NFF) が高濃度で検出されている。NFF は、その構造から、肝臓に蓄積し易いものと推定される上、肝機能障害の原因物質の候補の一つとなっている。他方、同物質の毒性や薬理活性については全く実験的な知見の蓄積がない。したがって、NFF が肝臓障害の原因物質とは断定できない状況であり、また、他の未知の化学物質が肝臓障害を引き起こしている可能性も否定できない。

本研究では、問題となっている未承認医薬品等について詳細な分析を行い、肝臓障害等を引き起こす可能性のある物質を化学的に検討するとともに、NFF の大量調製法の検討を行い、次いで実際に動物実験に必要な量の NFF を調製し、NFF について毒性に関する研究を行うものである。

B 研究方法

B-1 NFF の大量合成法の開発と合成

NFF の合成は環境への負荷および合成実施者の安全を考慮し、専用の空調設備を備えた区域内に設置したドラフト（排ガス洗浄装置付き）を用いて実施した。以下に代表的な合成例を示す。

フェンフルラミン(FF)塩酸塩 100 g に水 500

mL および 30%亜硝酸ナトリウム水溶液 125 mL を加え、室温で攪拌した。FF 塩酸塩が完全に溶解後、濃塩酸 100 mL を 10 分かけて滴下し 30 分間攪拌した。反応液に水 600 mL を加え、ジエチルエーテル 300 mL で目的物を抽出した。ジエチルエーテル層を水 500 mL で 2 回洗浄後、飽和食塩水 400 mL で繰り返し洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥しジエチルエーテルを留去後、真空乾燥を行い目的化合物 96.1 g（収率 98.8%）を得た。

B-2 未承認医薬品及び健康食品の成分の分析、単離、構造決定並びに分析法の検討

予備毒性実験用の NFF（約 10g）は、富山県で収去された「茶素減肥」のカプセル内容物より各種クロマトグラフィーを利用し単離した。成分分析に使用した「御芝堂減肥膠囊」、「紆之素膠囊」、「茶素減肥」、「御芝堂清脂素」は、おもに厚生労働省監視指導・麻薬対策課より、提供を受けたものを用いた。各製品のプロファイル分析は、LC を利用した。含有化合物の定性分析は、LC/MS、LC/HRMS、GC/MS、LC/PDA 分析により行った。含有化合物の定量分析は、LC を用いた。未知成分の構造決定は、MS、HRMS、NMR 等により行った。乾燥甲状腺末の分析は、プロテアーゼを用い、酵素加水分解後、LC/MS により行った。

B-3 NFF の毒性実験

被験物質として、7 日間の強制経口投与試験では当研究所の生薬部で出した NFF を、28 日間反復投与毒性試験では有機化学部が合成した NFF を使用した。なお両物質は、各種スペクトルデータの完全な一致から同一物質であることが確認されている。また合成品の HPLC 分析によって算出された純度は 98.34%であった。動物は、予備試験及び 28 日間反復投与毒性試験とも 6 週齢の F344 ラット雌雄を使用した。

投与用量の決定は、ラットを用いた 7 日間の強制経口投与試験を参考にした。即ち、死亡の認めら

れず肝臓重量増加等の明らかな変化の認められた 70mg/kg を最高用量とし、公比は $\sqrt{10}$ として 20 mg/kg 及び 7 mg/kg を中間用量、最低用量を 2 mg/kg とし、投与量を 2 ml/kg とし、28 日間連続して強制経口投与した。

回復試験群は、対照及び最高用量群の 2 群について 28 日間連続して胃ゾンデにより強制経口投与した後、14 日間の休薬期間をおいた。

一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を行い、28 日間の投与後、エーテル麻酔下でラットの眼窩静脈叢より採血し、全血を用いて血液学的検査を行い、また分離した血清を用いて血液化学的検査を行った。剖検後、器官重量を測定し、その他の器官及び組織についても摘出し、固定後、組織標本を作製し、病理組織学的検査を遂行中である。

C. 結果と考察

C-1 NFF の大量合成法の開発と合成

FF を室温で塩酸酸性条件下亜硝酸ナトリウムと反応させることにより、高純度の NFF を回転異性体 (syn 型および anti 型異性体) の混合物として高収率で得ることが出来た。

NFF は HPLC 分析の結果、保持時間 5.02 分 (主異性体) および 5.42 分 (副異性体) にそれぞれ回転異性体である主要ピークおよび副ピークを 86 : 14 の面積比で与えた。この 2 本のピーク以外には、ピークは殆どあるいは全く認められず、この保持時間 5.02 分および 5.42 分の両ピークの間面積の合計は全ピーク面積の 98.3-100 %であった。LC-MS 分析では両ピークとも同一分子イオンピーク (M+1 261) を与えた。さらに ^1H NMR においても、副異性体に起因するピーク微少なシグナルが認められ、NFF が回転異性体の混合物であることを支持した。

FF を緊急に調製することを想定し、合成法を情報検索した。FF の合成として、35 ヒットしたものの、その多くは FF の不斉合成または分割に関する

ものであった。ラセミ体の合成法の報告としては 1-(3-トリフルオロメチルフェニル)プロパン 2-オンを鍵中間体として、還元的アミノ化反応により FF を合成する合成経路がほとんどであり、妥当な合成経路と考えられた。

本研究により実験室に大量スケールでの NFF 合成が可能となった。本反応では、後処理過程で、過剰使用した亜硝酸を除去するためにジエチルエーテル層を十分に飽和食塩水で洗浄する必要がある。反応スケールが上記スケールを上回ると、実験室的には洗浄操作の効率が落ち、NFF に亜硝酸が混入する危険性がある。さらにスケールアップすると四酸化窒素の発生量が増大することも考慮し、100 g のスケールが実験室的な取り扱いには適当と判断された。

NFF の syn 型 および anti 型は回転障壁のため存在する異性体のため、NFF の熱力学的に安定な配座を有する異性体が主生成物であると考えられる。そこで、計算化学的手法を用いて NFF の最安定配座を計算した。分子力場法 (パラメーター : MM2) および半経験的分子軌道法 (MOPAC、パラメーター : AM1 および PM3) を用いて計算した結果、最安定配座はすべて anti 型であった。これらのことより、主生成物は「anti 型」副生成物は「syn 型」と推測される。未承認薬から単離された NFF も 2 種の回転異性体 (anti および syn) の混合物であり、その異性体の存在比は約 9:1-10:1 であり、anti 型が主成分であった。

C-2 未承認医薬品及び健康食品の成分の分析、単離、構造決定並びに分析法の検討

健康被害の特に多い 3 製品「御芝堂減肥胶囊」、「紆之素胶囊」、「茶素減肥」の製品分析の結果、これらの製品に 3% 程度の N-nitroso-fenfluramine (NFF) が含まれていることが判明した。さらに、これらの製品はプロファイルは互いに類似しており、NFF 以外に、共通して nicotinamide, gallic acid, epigallocatechin, caffeine,

catechin, riboflavine, epicatechin, epigallocatechingallate, gallocatechingallate, epicatechingallate を含んでいることを示した。また、各製品のロットについて分析した結果、NFF の使用は、遅くとも平成 12 年半ばには始まっており、その製品中濃度は、初期には低かったが、平成 13 年半ば以降では、3%程度（最高 5.2%）まで増加したことが判明した。さらに、NFF 含量について、各製品のロットごとに分析を行った結果、NFF が肝機能障害の原因物質とすると、健康被害の発生状況と分析結果に矛盾が生じないことが明らかとなった。また NFF 以外の多くの物質は、日常的に食品から摂取される物質であり、肝機能障害の原因物質の可能性をもたず、また含有が確認された FF 等の医薬品成分も肝機能障害を引き起こすとは考えにくく、これらの点からも NFF が原因物質である可能性が高いものと考えられた。

次に、試料として比較的大量に入手できた「茶素減肥」(1154 g) より、投与量決定のための予備的な毒性実験で使用する NFF の大量抽出単離を行うとともに、他成分についても単離構造決定を行った。その結果、ヘキサン分画 (55 g)、酢酸エチル分画 (90g)、メタノール分画 (301 g) が得られた。ヘキサン分画 (55 g)より、NFF (10.6 g) が、酢酸エチル分画より caffeine、nicotinamide が、メタノール分画より、pyridoxine、dihexyl phthalate、4'-methoxyapigenin 並びに 4'-methoxyluteolin が単離構造決定された。NFF 以外で単離された成分は、ビタミン類、可塑剤、フラボノイド誘導体であり、肝臓機能障害に関与する可能性は考えられず、本実験でも、NFF 肝機能障害に関与している可能性が高いものと考えられた。

また別に、一部未承認医薬品中に含まれていた乾燥甲状腺末は、USP25 にその分析法が記載されているものの、多数の成分が含まれる未承認医薬品や健康食品からは、迅速分析が困難であった。そこで、各種前処理法を検討したところ、50%アセトン

およびアセトンで処理することにより、USP25 に記載された条件で効率よく加水分解されることが明らかとなり、LC/MS と組み合わせ、迅速分析が可能になった。

C-3 NFF の毒性実験

NFF を 28 日間投与することにより、器官重量における肝臓の絶対及び相対重量、血液化学的検査においてアラニンアミノトランスフェラーゼ及びアルカリフォスファターゼ等に高値が認められ、70mg/kg 群では肝臓に障害が起きている可能性が高いことが推察された。

本試験結果における血清中アラニンアミノトランスフェラーゼの上昇は、肝実質細胞の壊死を含む細胞障害と考えられるが、上昇の程度が軽微であるため壊死は広範囲に及ぶものではないと思われる。血清中のコリンエステラーゼの活性低下は肝細胞における合成系の障害が示唆され、血清中のトリグリセリド及び総コレステロールの高値から、肝実質細胞の脂質代謝障害が示唆された。従って、NFF の 28 日間投与の投与により、肝臓に肝実質細胞の壊死を含む細胞障害が起きている可能性が高いことが考えられた。

NFF を 28 日間 70mg/kg 投与した後に休薬をすると、摂餌量は増加し、それに伴い体重も対照群に急速に接近した。14 日間の休薬により、肝臓の絶対及び相対重量は対照群とほぼ同等の値となるが、血液化学的検査におけるアラニンアミノトランスフェラーゼの高値が残っていることから、回復傾向にあるものの完全には回復に至っていないものと考えられた。

D. 結論

中国から輸入されたダイエットを目的とした複数の未承認医薬品（「御芝堂減肥胶囊」、「紆之素胶囊」、「茶素減肥」）が引き起こした肝機能障害の原因究明を目的として、これらの未承認医薬品について析を行い、NFF、FF、乾燥甲状腺末（検出さ

れない製品もある) 及び、ビタミン類、カテキン類、等を確認、同定した。また「茶素減肥」より、別に pyridoxine、dihexyl phtalat 及び、2 種のフラボノイドを単離同定した。NFF 以外の多くの物質は、日常的に食品から摂取される物質であり、肝機能障害の原因物質の可能性をもたない。また含有が確認された FF 等の医薬品成分も肝機能障害を引き起こすとは考えにくい。また、NFF が肝機能障害の原因物質とすると、健康被害の発生状況と分析結果に矛盾が生じないことが明らかとなった。そこで、毒性実験を遂行することとし、毒性実験に使用する NFF の安全な高純度大量合成法の開発を行った。次いで合成された NFF を用い毒性実験を行ったところ、NFF は、一過性の神経症状と共に摂餌量の減少、体重増加抑制作用を示した。また、血清生化学検査における各種指標の推移を考慮し、同物質は、肝細胞性の障害のみならず、胆管系への障害の可能性も含む広義の肝障害を惹起するものと推察され、上記肝障害の原因物質である可能性が非常に高いことが明らかとなった。また、回復実験では、14 日間では、完全には回復に至っていないもの明白な回復傾向が見られた。従って、NFF による肝障害は、摂取を中止すれば、回復する可能性があることが考えられた。

E.研究発表

各、分担研究報告書に記載している。なお、本研究の概要は、平成 15 年 2 月 12 日、厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課から報道発表された。また、厚生労働省のホームページ(<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/02/h0212-1.html>) でも知ることが出来る。

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
分担研究報告書
N-ニトロソフェンフルラミンの大量合成法の開発と検討

主任研究者 奥田晴宏 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長

研究要旨 N-ニトロソフェンフルラミン(NFF)は中国から輸入された健康食品および未承認医薬品中に同定された物質であり、これら未承認薬等の摂取者に高頻度で発生した肝障害の原因物質として推定されている。本研究において NFF の毒性学的研究に供することを目的として、フェンフルラミンと亜硝酸ナトリウムとの反応による NFF の安全な高純度大量合成法を開発し、大量合成（720 g）を実施した。合成された NFF は、未承認薬から単離された NFF と同様、syn/anti 異性体の混合物であり、HPLC で分離可能であった。

A. 研究目的

中国から輸入されたダイエツトを目的とした未承認医薬品および健康食品により、全国で 800 名（内死者 4 名）を越える肝機能障害を中心とする健康被害が発生し、大きな社会問題となった。これら未承認薬の多くから N-ニトロソフェンフルラミン（NFF）が高濃度で検出されたことから、NFF が肝障害の原因物質と推定されているが、NFF の毒性学的な情報は皆無である。

一方、NFF の合成に関してもほとんど知見がなく、亜硝酸ナトリウムを用いて、フェンフルラミン（FF）をニトロソ化し、NFF を微量調製したとする報告があるのみである。この研究は FF の絶対構造を決定するために実施されたため、CD 曲線に関するデータ以外には一切 NFF の構造に関する機器データは報告されていない。

本研究においては、NFF の毒性評価のための動物実験に供するため、NFF の大量合成を開発し、十分な量の NFF を合成することを第一の目的とする。NFF の大量合成

法検討に際しては、以下のことを考慮した。

①NFF は油状物質であり、再結晶による精製が困難なことから、副生成物を与えない反応条件を検討する。②ニトロソ化の際に有毒な四酸化二窒素が発生することおよび NFF の汚染を防止すべきことから安全性の高い調製法を開発する。

FF は食欲抑制剤として開発されたが、現在では米国ではその副作用から医薬品としては販売中止となっている。本研究を開始した時点では、試薬としては海外から輸入可能であるものの、国内在庫が乏しく、また覚醒剤に類似した構造から速やかな入手が困難な物質であった（なお、極めて最近国内メーカーが FF および NFF の販売を開始したが、緊急時に大量入手が可能かどうかは不明である）。緊急に大量に NFF が必要になったときには FF を合成することが必要となる。緊急事態に速やかに合成できるようにするため、FF の合成を文献的に検討することを第 2 の目的とした。

B. 研究方法

(倫理面の配慮) 本分担研究課題は合成化学研究であるため特に倫理面に配慮すべき事項はない。

1. 試薬・測定機器等

FF はバイオテック・ラボより購入した。他の試薬・溶媒はすべて、試薬一級あるいは特級を使用した。また NMR 分析は AS400 (Varian)、LC-MS 分析は 2767 Sample Manager、1525 Binary HPLC Pump、2996 Photodiode Array Detector、MicromassZQ (Waters)、PEGASIL ODS カラム (4.6 φ x 150mm、センシユウ科学社)、HPLC 分析は LC10A Pump、SPD-10A Detector (Shimadzu)、PEGASIL ODS カラム (4.6 φ x 150mm、センシユウ科学社) 紫外・可視吸収スペクトルは Agilent 8453 (Agilent) を用いて行った。

2. NFF の合成

NFF の合成は環境への負荷および合成実施者の安全を考慮し、専用の空調設備を備えた区域内に設置したドラフト (排ガス洗浄装置付き) を用いて実施した。

FF 100 g を用いた反応例を下記に示す。

FF 塩酸塩 100 g に純水 500 mL および 30% (v/w) 亜硝酸ナトリウム水溶液 125 mL を加え室温で攪拌した。FF 塩酸塩が完全に溶解後、濃塩酸 100 mL を 10 分かけて滴下し 30 分間攪拌した。塩酸滴下時に発生する四酸化二窒素は水酸化ナトリウム水溶液にて捕捉処理した。反応液を分液ロートにあけ、純水 600 mL およびジエチルエーテル 300 mL を加え目的物を抽出した。ジエチルエーテル層を蒸留水 500 mL で 2 回洗浄後、飽和食塩水 400 mL でジエチル

エーテル層が淡黄色を示すまで繰り返し洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥しジエチルエーテルを留去後 (ジエチルエーテルに四酸化二窒素が溶解しているため、留去の際には排気に注意する)、真空乾燥を行い目的化合物 96.1 g (収率 98.8%) を得た。

NMR

主異性体: ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.975 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 1.51 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, $-\text{CHCH}_3$), 3.09 (dd, 1H, $J_{\text{Ha-Hb}} = 14.0$ Hz, $J_{\text{Ha-CH}} = 6.8$ Hz, $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$), 3.25 (dd, 1H, $J_{\text{Hb-CH}} = 8.4$ Hz, $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$), 3.34 (qd, 1H, $J_{\text{Ha-CH}_3} = 7.0$ Hz, $J_{\text{Ha-Hb}} = 13.2$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 3.55 (qd, 1H, $J_{\text{Hb-CH}_3} = 7.0$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 4.69 (qdd, 1H, $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$), 7.34-7.50 (m, 4H, Aromatic H)

副異性体: ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.22 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, $-\text{CHCH}_3$), 1.40 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 2.75 (dd, 1H, $J_{\text{Ha-Hb}} = 13.8$ Hz, $J_{\text{Ha-CH}} = 8.2$ Hz, $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$), 3.00 (dd, 1H, $J_{\text{Hb-CH}} = 8.2$ Hz, $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$), 3.97 (qd, 1H, $J_{\text{Ha-CH}_3} = 7.2$ Hz, $J_{\text{Ha-Hb}} = 28.9$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 4.01 (qd, 1H, $J_{\text{Hb-CH}_3} = 7.2$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 5.01 (qdd, 1H, $-\text{CHCH}_2\text{Ar}$), 7.34-7.50 (m, 4H, Aromatic H)

質量分析

主異性体: 261 (M+H), 302 (M+H+MeCN)

副異性体: 261 (M+H), 302 (M+H+MeCN)

紫外・可視吸収スペクトル

NFF 3.05 mg をクロロフォルム 25 mL

(和光純薬工業、特級)に溶解し、 $4.69 \times 10^{-5} \text{ M}$ の溶液を調製した。本溶液の紫外外部吸収スペクトルを測定したところ、245 nm に吸収の極大を示した。

ピーク検出：245 nm、分子吸光係数： $4.77 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

3. 文献情報検索

SciFinder をデータベースとして用い、キーワードとして構造式と「synthesis」を用いた。

C. 研究結果

1. NFF の合成

FF を室温で塩酸酸性条件下亜硝酸ナトリウムと反応させることにより NFF が生成した。反応液をジエチルエーテルで抽出後、希塩酸および飽和食塩水で洗浄することにより、高純度の NFF を回転異性体 (syn 型および anti 型異性体) の混合物として高収率で得ることが出来た (図 1)。

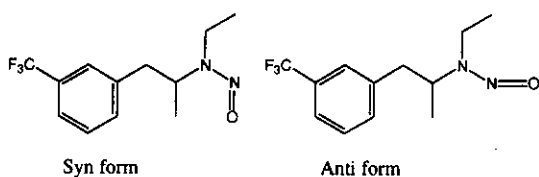


図 1 NFF の構造

NFF は HPLC 分析の結果、保持時間 5.02 分 (主異性体) および 5.42 分 (副異性体) にそれぞれ回転異性体である主要ピークおよび副ピークを 86 : 14 の面積比で与えた (図 2)。この 2 本のピーク以外には、ピークは殆どあるいは全く認められず、この保持時間 5.02 分および 5.42 分の両ピーク

の面積の合計は全ピーク面積の 98.3-100 %であった。

LC-MS 分析の結果、主異性体 (保持時間: 254 nm - 5.06 分, ES⁺ 261 - 5.04 分) および副異性体 (保持時間: 254 nm - 5.51 分, ES⁺ 261-5.52 分) とともに、261 (M+H) の分子イオンピークを与えた (図 3)。

400MHz プロトン NMR の結果も、 δ 1.22, 1.40, 2.75, 3.00, 3.97, 4.01, 5.01 に主異性体と類似した副異性体のシグナルを強度は弱いものを与えた。そのピーク強度比は約 85 : 15 であった (図 4)。

2. FF 合成法に関する文献情報調査

1-(3-トリフルオロメチルフェニル)プロペンを 2 価水銀イオン存在、エチルアミンと反応する合成法が、簡易 1 ステップ合成法として発表されていた。¹しかし、この反応は水銀を使用することから、環境への負荷を考慮すると好ましくなく、メタンフェタミン合成で汎用されている還元的アミノ化反応で合成することが適当と判断された。

D. 考察

N-ニトロソ化合物の N-N 結合は二重結合としての性質を部分的に有するため、自由回転ではなく、回転障壁が存在する。そのため非対称の N-ニトロソ化合物では syn 型および anti 型の立体配置に基づく異性体が存在する。この 2 種の異性体は通常 NMR で明らかに異なるシグナルを与える。Syn 型から anti 型に移行するときの遷移状態が 2 つの N 原子の孤立電子対の反発により不安定なため、回転障壁は極めて高く²、ある種の N-ニトロソ化合物では異性体が HPLC により分離されている。^{3,4}

NFF の syn 型 および anti 型は回轉障壁のために存在する異性体のため、NFF の熱力学的に安定な配座を有する異性体が主生成物であると考えられる。そこで、計算化学的手法を用いて NFF の最安定配座を計算した。分子力場法（パラメーター：MM2）および半経験的分子軌道法（MOPAC、パラメーター：AM1 および PM3）を用いて計算した結果、最安定配座はすべて anti 型であった。これらのことより、主生成物は「anti 型」副生成物は「syn 型」と推測される。未承認薬から単離された NFF も 2 種の回轉異性体（anti および syn）の混合物であり、その異性体の存在比は約 9:1-10:1 であり、anti 型が主成分で

あった。

実験室スケールの反応として、1 回に FF 塩酸塩 100 g の反応を行うことが出来た。本反応を 8 回実施することにより、NFF を合計 720 g 合成した。本反応では、後処理過程で、過剰使用した亜硝酸を除去するためにジエチルエーテル層を十分に飽和食塩水で洗浄する必要がある。反応スケールが上記スケールを上回ると、実験室的には洗浄操作の効率が落ち、NNF に亜硝酸が混入する危険性がある。さらにスケールアップすると四酸化窒素の発生量が増大することも考慮し、100 g のスケールが実験室的な取り扱いには適当と判断された。

図 2 合成した NNF の HPLC 分析

分析条件

高速液体クロマトグラフィー（移動相：アセトニトリル／水／トリフルオロ酢酸=600／400／1、カラム温度：37 度、測定波長：210 nm、流速：1.0 mL/min、注入量：5 μ L）より、30 分間測定した。

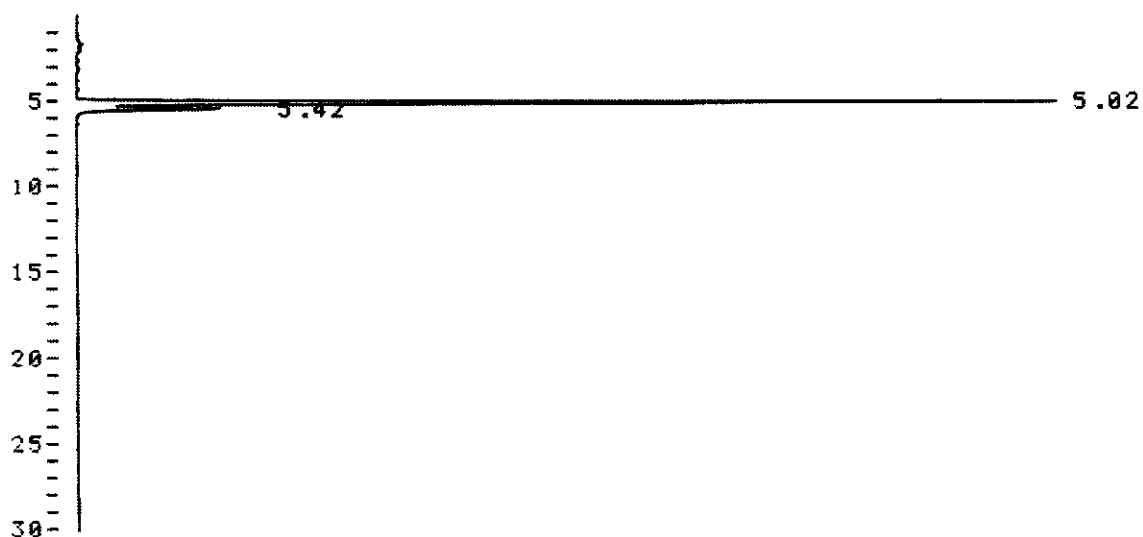


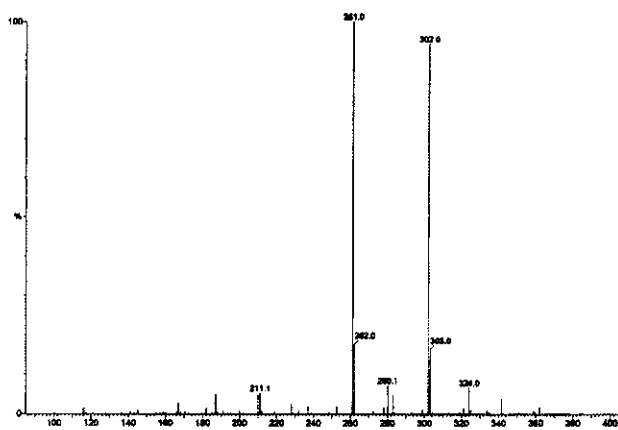
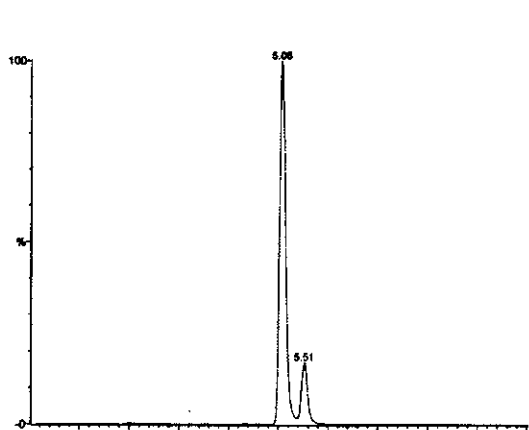
図3 合成した NNF の LC-MS 分析

分析条件

高速液体クロマトグラフィー（移動相：アセトニトリル／水／酢酸＝600／400／20、流速：1.0 mL/min、測定波長：254 nm 注入量：5 μ L）、質量分析（イオン化法：エレクトロスプレー法、検出イオン：陽イオン、コーン電圧：40.0 V）

UV: 254 nm

保持時間：5.04 分



保持時間：5.52 分

Scan: ES+ 261

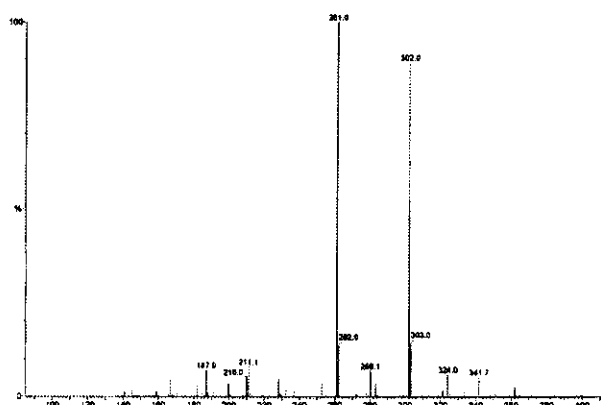
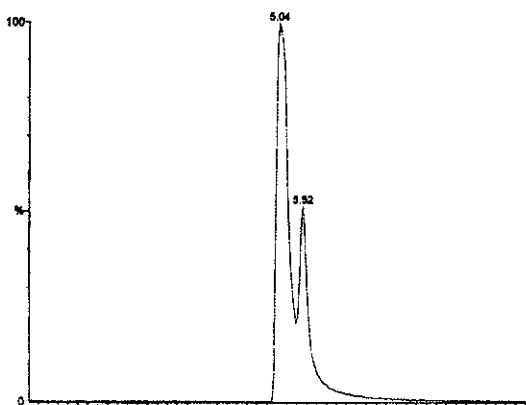
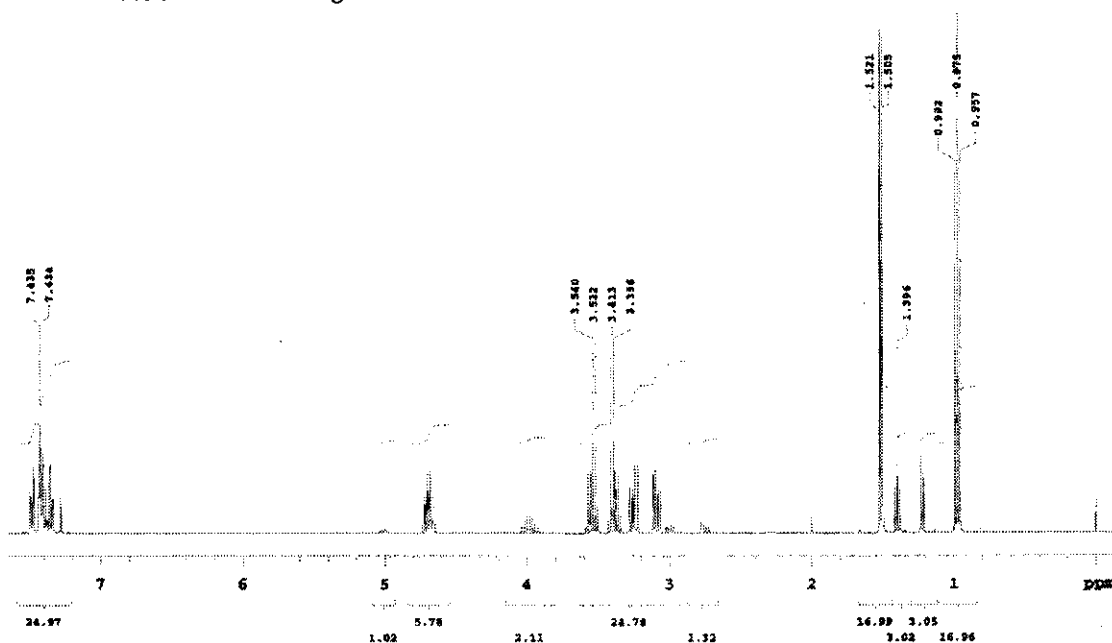


図4 NFF の 400MHz プロトン NMR

分析条件

サンプル濃度：NFF 25 mg / CDCl₃ 0.7 mL、測定温度：25 度



参考文献

1. Griffith R.C., *et al.*, *J. Org. Chem.*, **44**, 3580-3582 (1979).
2. Udayamapalayam, P., *et al.*, *J. Org. Chem.*, **57**, 6006-6014 (1992)
3. Farrelly, J.G., *et al.*, *Cancer Res.*, **48**, 3347-3349 (1988)
4. He, G. and Farrelly, J.G., *Cancer Let.*, **45**, 189-194 (1989)

E. 結論

NFF の安全な高純度大量合成法を開発し、720 g の合成に成功した。NFF は他の N-ニトロソ化合物と同様 syn/anti 異性体

の混合物であった。異性体は HPLC で分離可能であり、未承認薬から抽出された NFF と同様 anti 型が主成分と推定された。なお、本研究で合成された NFF を用いて、国立医薬品食品衛生研究所毒性部において本化合物の毒性試験が実施された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

登録及び登録予定共になし。

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業）

（分担研究報告書）

「未承認医薬品及び健康食品による健康被害の原因究明のための研究」
未承認医薬品及び健康食品の成分の分析、単離、構造決定並びに分析法の検討
分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長
未承認医薬品及び健康食品の成分の分析、構造決定

研究要旨 中国から輸入された、未承認医薬品のうち、特に健康被害の多い 3 製品「御芝堂減肥胶囊」、「紆之素胶囊」、「茶素減肥」について製品分析を行い、これらの製品に 3%程度 N-nitroso-fenfluramine (NFF)が含まれていることを明らかにした。さらに、これらの製品はプロファイルは互いに類似しており、NFF 以外に、共通して nicotinamide, gallic acid, epigallocatechin, caffeine, catechin, riboflavin, epicatechin, epigallocatechin gallate, gallic acid, epigallocatechin gallate を含んでいることを示した。また、各製品のロットについて分析した結果、NFF の使用は、遅くとも平成 12 年半ばには始まっており、その製品中濃度は、初期には低かったが、平成 13 年半ば以降では、3%程度（最高 5.2%）まで増加したことが判明した。

協力研究者

川原信夫（生薬部室長）

鎌倉浩之（生薬部主任研究官）

代田 修（生薬部主任研究官）

花尻瑠理（生薬部室長）

A. 研究目的

中国から輸入された、未承認医薬品のうち、特に健康被害報告の約 60%を占めた 3 製品「御芝堂減肥胶囊」、「紆之素胶囊」、「茶素減肥」及び、「御芝堂減肥胶囊」の旧製品と思われる「御芝堂清脂素」について、健康被害の原因物質解明の一環として、成分分析並びに構造決定を行うことを目的とした。また、入手できた上記未承認医薬品を用い、肝障害の原因物質の可能性が考えられた N-nitroso-fenfluramine (NFF) について、定量分析を行い、時系列的な含量変化を調べ、健康被害事例の発生との関連を推定した。

B. 研究方法

B-1 分析に用いた試料

分担研究者がインターネットを利用し購入した「御芝堂減肥胶囊」以外は、すべて厚生労働

省監視指導・麻薬対策課から提供を受けた。

「御芝堂減肥胶囊」：2002 年（平成 14 年）7 月 12 日に公表した本製品に係る肝障害事例事例（死亡事例 1 例、入院事例 1 例）のうち、入院事例で服用されていたものを主な分析試料として用いた。なお、「御芝堂減肥胶囊」は、製造日より NFF の含有量の変動が大きく、死亡事例のものと入院事例のものでも含有量に差があるが、NFF 以外は、どの製品も、ほぼ同一の成分組成であることを確認した。

「紆之素胶囊」：2002 年 7 月 12 日に公表した肝障害事例（1 例）で服用されていたものを主に用いた。

「茶素減肥」：2002 年 7 月 12 日に公表した肝障害事例（外来事例）で服用されていたものはサンプル量が少ないため、これに代えて富山県において収去されたものを主な分析試料として用いた。

B-2 製品の製造年月日

「紆之素胶囊」と「茶素減肥」については、製品の外箱の外面に製造年月日が記載されていた。「御芝堂減肥胶囊」については、外箱上蓋裏面に例えば「合格 2001/09/28 2003/09/28」のような 2 つの日付の記載があった。この製品

の品質保持期間（保質期）は 24 月とされていることから、後の日付は品質保持期限を示し、前の日付は製造年月日を示すものと推定した。よって、本品については、外箱上蓋裏面に記載されている「合格」日付のうち前の日付を製造年月日として取り扱った。

B-3 標品

NFF は、国立医薬品食品衛生研究所で、fenfluramine (FF)より合成したもの（ラセミ体）を用いた。FF は、シグマ社製の塩酸塩のものを使用した。また、caffeine (CAF)、nicotinamide (NA), riboflavine (VB2) は、アルドリッチ社製のもの、gallocatechin (GC), epigallocatechin (EGC), catechin (C), epicatechin (EC), epigallocatechingallate (EGCG), gallocatechingallate (GCG), epicatechin-gallate (ECG) は、フナコシ薬品より購入したものを使用した。

B-4 分析機器

LC/MS : Waters1525 バイナリーポンプに、Waters ZQ MS 及び 2996 PDA 検出器を組み合わせたもの及び、Agilent1100 ポンプに Applied Biosystems QStar Pulsar I を組み合わせたものを使用した。GC/MS : 島津 GCMS-QP5050 を用いた。LC: 島津 LC-10Avp システム (LC-10ATvp, SPD-10AVvp, C-R4AD) または、島津 LC-9AD システム (LC-9AD, SPD-6AV, C-R4A) を用いた。

B-5 分析条件

プロファイル分析は、Waters 社製装置を用い、以下の LC/ PDA/ MS 条件で測定した。移動相 : A=0.1 % ギ酸溶液 / B=0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液 グラジエント 0 分 (A/ B=95/ 5) → 30 分 (A/ B=85/ 15) → 50 分 (A/ B=30/ 70) → 60 分 (A/ B=20/ 80)、流速 : 1.0 mL/ min、カラム : Mightysil RP-18 GP 4.6 mm id x 250 mm、カラム温度 : 40°C、MS イオン化 : ESI positive。

LC/ HRMS は、Applied Biosystems 社製装置を用い、プロファイル分析と同様の LC 条件下、ESI positive モードで、無水フタル酸 (m/z [M+H]149.0233) 及びレセルピン (m/z [M+H]609.2807) を校正マスに用い測定した。

LC/ MS による NFF の定性確認は、Waters 社製装置を用い以下の条件で行った。移動相:ア

セトニトリル/水/酢酸 (60/40/2) アイソクラティック、流速:1.0 mL/ min、カラム: Inertsil ODS 3, 4.6 id×250 mm (GL Sci.)、カラム温度: 40°C、MS イオン化 : ESI positive。

GC/ MS による NFF の定性確認は、以下の条件で行った。キャリアガス : He (75 kPa)、カラム: OV-1701 0.25 mm id x 0.25 μ m df x 25 m、カラムガス流量 : 1.2 mL/ min スプリット比 21、注入口温度 : 230°C、インターフェース温度 : 230°C、カラム室温度 : 100°C (10min) → 3°C/ min → 150°C → 5°C/ min → 230°C、MS イオン化は、EIで行った。

LC による NFF の定量は、島津製 LC-10Avp システムを用い、以下の条件で行った。カラム : Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 250 mm)、移動相 : 0.1 % TFA アセトニトリル:0.1 % TFA 水 (60 : 40)アイソクラティック、検出波長 : 210 nm、流量 : 1.0 mL/ min、カラム温度 : 40 ° C。

GC/ MS による FF の定性確認は、島津社製装置で、以下の条件で行った。カラ : OV-1701(25m, i.d. 0.25 μ m, GLサイエンス)、キャリアガ : He、流 : 26ml/ min (スプリット比 21)、気化室温 : 230°C、インターフェース温度 : 250°C、カラム温度 : 120°C 10 分保持 200°C まで 3°C 毎分で昇温後 10 分間保持、イオン化:EI。

LC による FF の定量は、LC-9SAD システムを用い以下の条件で行った。移動相 : アセトニトリル/水/TFA (510/490/1) 1 L に 6 g の SDS を加えた溶液、カラム : Nucleosil 5C18, 4.6 i.d. × 150mm、カラム温度 : 室温、流速 : 1.0ml/ min、検出波長 : 210nm。

C. 研究結果および考察

C-1 初期分析

平成 14 年 7 月の段階で、「御芝堂減肥胶囊」、「紆之素胶囊」、「茶素減肥」3 製品について、報告を受けた主な健康被害は、肝機能障害と、甲状腺障害であった。このうち、「紆之素胶囊」は、既に、2000 年に、甲状腺末を含むことで、薬事法違反品として摘発（同年 12 月及び 2001 年 6 月の 2 回に渡り注意喚起並びに都道府県に監視指導を要請）された製品であり、これらの製品が、同様の原因で甲状腺障害を引き起こした可能性が示唆された。他方、肝機能障害を生

じる成分については、報告がなかった。

日本では食品の場合、効能・効果或いは人の構造機能に影響を及ぼすような表現を行えば薬事法に抵触するが、明確に有害物であると判断されない限り、食品衛生法違反は問にくい。他方 positive list 制の薬事法では、該当物質を含めば未承認医薬品として処分することが可能となる。従って、初期段階では、死亡例を含む健康被害報告を受けた上記 3 製品について、流通を停止させるため、薬事法違反を問えるかどうかについて検討を行った。

分析対象としては、ダイエット食品中にこれまで含まれた例があり、薬事法で規制を受ける成分である FF と、上述した甲状腺末に絞った。その結果、FF は、LC 及び GC/MS により「紆之素胶囊」、「茶素減肥」より 0.01%、0.004% 検出され、「御芝堂減肥胶囊」からは検出されなかった（その後、別のロットのものからは検出）。甲状腺末は、酵素分解後、LC/MS による thyroxine, tri-iodothyronine の検出による確認を行った。その結果、「紆之素胶囊」に明らかに含まれていることが、「茶素減肥」には微量含まれている可能性が高いことが判明した（以後、別ロットの「御芝堂減肥胶囊」から、甲状腺末が検出報告されている）。従って、この段階では「御芝堂減肥胶囊」は、成分において薬事法違反が問えず、7月12日「減肥」という名称が、

医薬品として判断される効能・効果を標榜しているとして、報道発表された。

C-2 NFF の同定

しかし、依然として健康被害の原因物質は不明である上、検出された甲状腺末及びFF含量では、肝機能障害が生じるとは考えられず、さらなる分析を行った。その結果、「御芝堂減肥胶囊」カプセル含有物について塩酸加水分解すると、FF含量が数%程度となることが判明し、FFの誘導体が製品中に存在していることが明らかとなった。さらに、誘導体はエーテル抽出画分に存在することが判明したため、同抽出物についてLC/MSを測定したところ、 m/z 261(M+H), 302(M+MeCN)の疑似イオンピークを示す強度比約10:1の2本のピークが検出された（ニトロソアミンのシストランス異性と考えられる）。分子量を考慮すると、本ピークはFF ($M_w=230$) のニトロソ体である可能性が推定された。さらに、本化合物をLCで分取し、 $^1\text{H-NMR}$ を測定したところ、FF誘導体であることが確認された。最終的に、FFを塩酸酸性下、亜硝酸ナトリウムでニトロソ化した化合物と単離化合物を比較した結果、両者のLCの保持時間及び、スペクトルデータが一致したため、これらの製品には、NFFが含まれている事が明らかとなった。さらにLCによる定量の結果、3製品とも約3%のNFFが含まれている事が判明した。NFFとFFの構造を図1に示す。

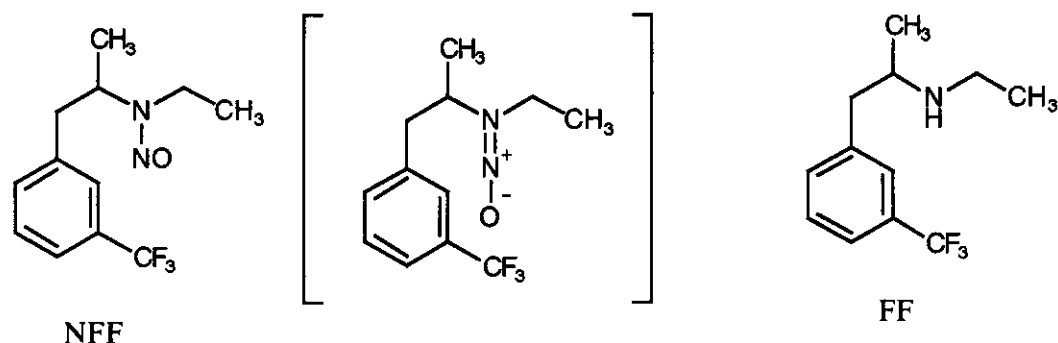


Fig.1 Structures of N-nitroso-fenfluramine (NFF) and fenfluramine (FF)

論文検索の結果NFFの毒性及び薬理活性に関して、実証的な研究情報が全くないことが明らかになった。従って、この段階では本物質は、肝機能障害の原因物質であるか不明であるだけでなく、食品衛生法で規制する有害成分であるか判断する

材料がない（常識的に科学で考えれば、有害物質であろうと推定されるが）と考えられた。他方、同物質は、その構造からFFと同様ダイエット効果（食欲抑制効果）を期待して（目的として）人為的に合成、添加されたと推定される。従って、薬

事法で取り扱う医薬品成分と判断され、予防的視点から有害物質とみなした上で、これを含有する健康食品については、未承認医薬品とみなすことが適当であるとされた。このような判断に基づき、7月22日NFFの検出及び、同物質が含まれている製品について、未承認医薬品として取り扱うことが報道発表された。さらに、同日から、地方衛生研究所に対し、分析法について情報提供を行い、取り締まりの徹底に協力した。国立医薬品食品衛生研究所のWebsite (<http://www.nihs.go.jp/topics/topicsindex.html>) にのせた分析例を図2に示す。また、韓国とシンガポールの関係部署に FAXで情報提供した文書を以下に示す。

Detection method for N-nitroso-fenfluramine

The detection method which we recommend for N-nitroso-fenfluramine is as follows.

LC/MS condition

Mode: positive, ESI

Column: Inertsil ODS 3 (GL Sciences, Tokyo), 4.6 x 250 mm

Temperature: 40°C

Mobile phase: MeCN/ Water/ Acetic acid (60/ 40/ 2)

Flow rate: 1.0 mL/ min

Injection volume: 15 µL

By LC/MS using the conditions described above, N-nitroso-fenfluramine was detected as two forms (endo- and exo- forms) at 12.6 min and 14.0 min. Both signals show quasi-molecular ion peaks at m/z 261 (M+H) and m/z 302 (M+H+MeCN). The UV absorption maxima of the compound were observed at 210 nm and 234 nm.

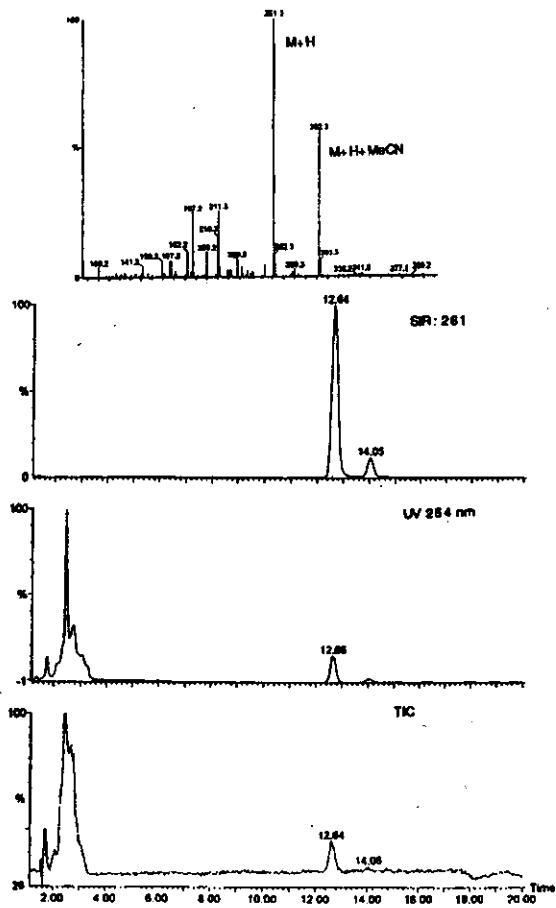
肝臓機能障害の原因物質が、NFF であるかどうかを明らかにするには、毒性実験が不可欠である。FF の LD50 値 (ラット 100~200mg/ kg) から推定すると、毒性実験を行うには、最低 100 g 程度の NFF が必要となる。残念ながら、この段階で我々が保有するフェンフルラミンは数 g であり、毒性実験に十分な NFF を合成できる

FF 量ではなかった。そこで、監視指導・麻薬対策課を通じて新たに入手した「茶素減肥の」カプセル (約 5000 カプセル) より NFF を分離抽出することにした (詳細については、別に記述した)。また、同時にカプセルに含まれる FF、NFF 以外の物質について、成分分析を続けることとした。

C-3 NFF, FF 以外の分析

HPLC/PDA の分析から、3 製品のクロマト上のプロファイルは非常に似ていることが明らかとなった (図 3)。従って、これら 3 製品が共通の原料をベースにして製造されたか、あるいは、共通の処方ベースに製造された可能性が考えられた。210nm の検出波長では、3 製品に共通する主ピークは FF、NFF を含め 13 本 (保持時間: 4.2, 11.7, 15.9, 17.2, 17.8, 20.3, 21.6, 22.1, 23.6, 29.0, 29.4, 51.8, 52.5 min) あった。そこでこれらのピークにつき、LC/TOF-MS を用い高分解能 MS を測定し、化合物の推定を行ったところ、保持時間の短い順に、nicotinamide, gallic acid, epigallocatechin, caffeine, catechin, riboflavin, epicatechin, epigallocatechin gallate, gallic acid gallate, epicatechin gallate, FF, NFF (2 本) であると考えられた。そこで、さらに標品と保持時間、スペクトルの比較を行い、これらの化合物が含まれていることを明らかにした。

各製品におけるこれらの化合物の含量を図 4 に示す。これらの化合物の含量を総計すると、カプセル含有物の 10% 程度となる。また、catechin 類の含量を合計すると、茶素減肥で 2.5% 程度、それ以外の 2 製品で 1.2%、1.5% となり、「茶素減肥」に特に多く含まれていることが判った。catechin 類は、茶に 10~15% 含まれていることが知られており、その点を考えると、カプセル内の含有物の 1-2 割程度は茶由来の物質であるかもしれない。また「茶素減肥」の 1 製品 (外来事例で収去された試料) では、下剤として知られている phenolphthalein も 1% 検出されたが、他の製品では検出されなかった。NFF を除き、これまでに同定された物質は、全て肝臓機能障害を示す可能性を持たない。従って、NFF が原因物質である可能性が非常に高い。



LC/PDAによるN-ニトロソフェニルアミンの分析法

1. LC条件

カラム: Inertsil ODS-3, 4.6i.d × 150 mm (GL Sci), カラム温度: 40℃, 移動相: アセトニトリル (600 mL) / 水 (400 mL) / トリフルオロ酢酸 (1 mL) 混液, 流速: 1.0 mL/min, 注入量: 5 µL.

2. 結果

保持時間 6.6 分 (および 7.2 分前後) に 230 nm および 234 nm 付近に最大吸収を有するピークが認められる場合, N-ニトロソフェニルアミンと同一 LC/MS の場合と同様にシス・トランス異性体と考えられる2つのピークが検出された。以下に保持時間 6.6 分におけるスライススペクトルを記載する。

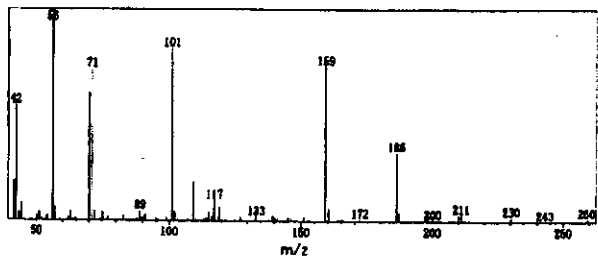
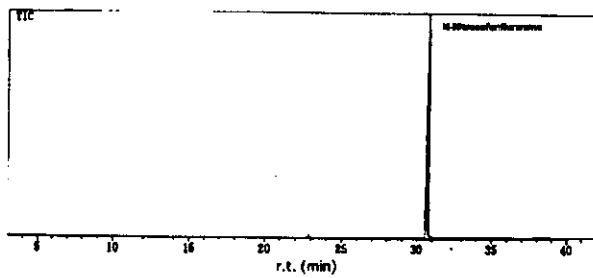
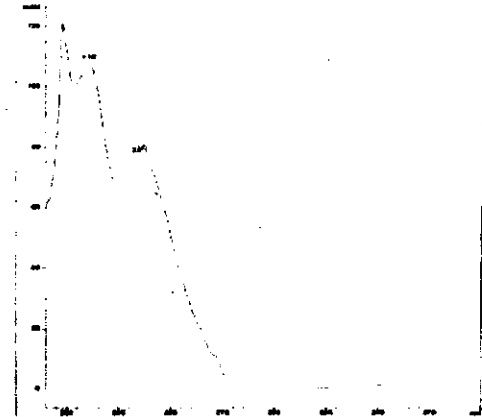


Fig.2 LC/MS, LC/PDA and GC/MS data shown on our website

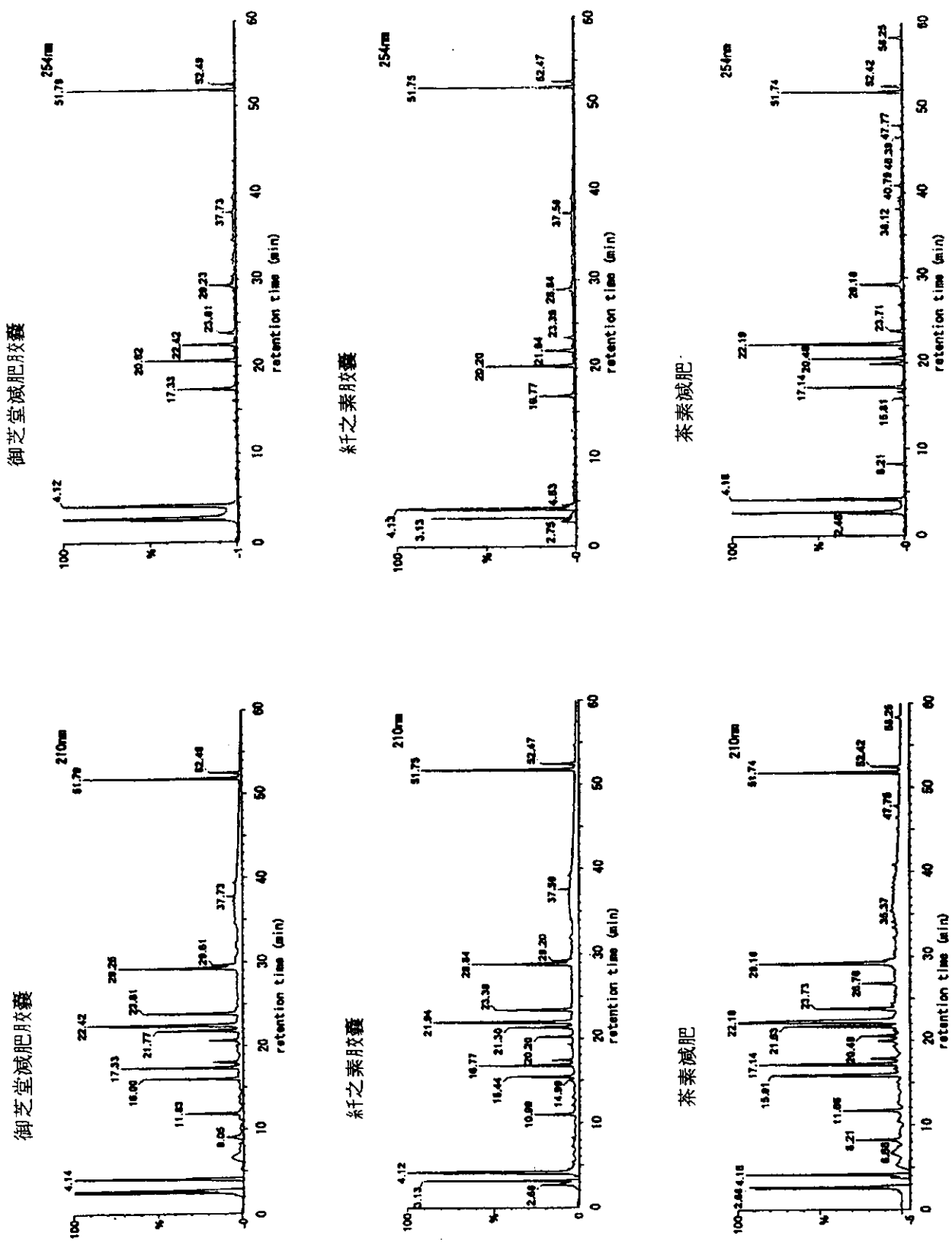


Fig. 3 HPLC profile of the slimming pills, Onshido-Genpikono (upper), Sennomoto-Kono (middle) and Chaso-Genpi (lower), at UV 210 nm (left) and UV 254 nm (right)

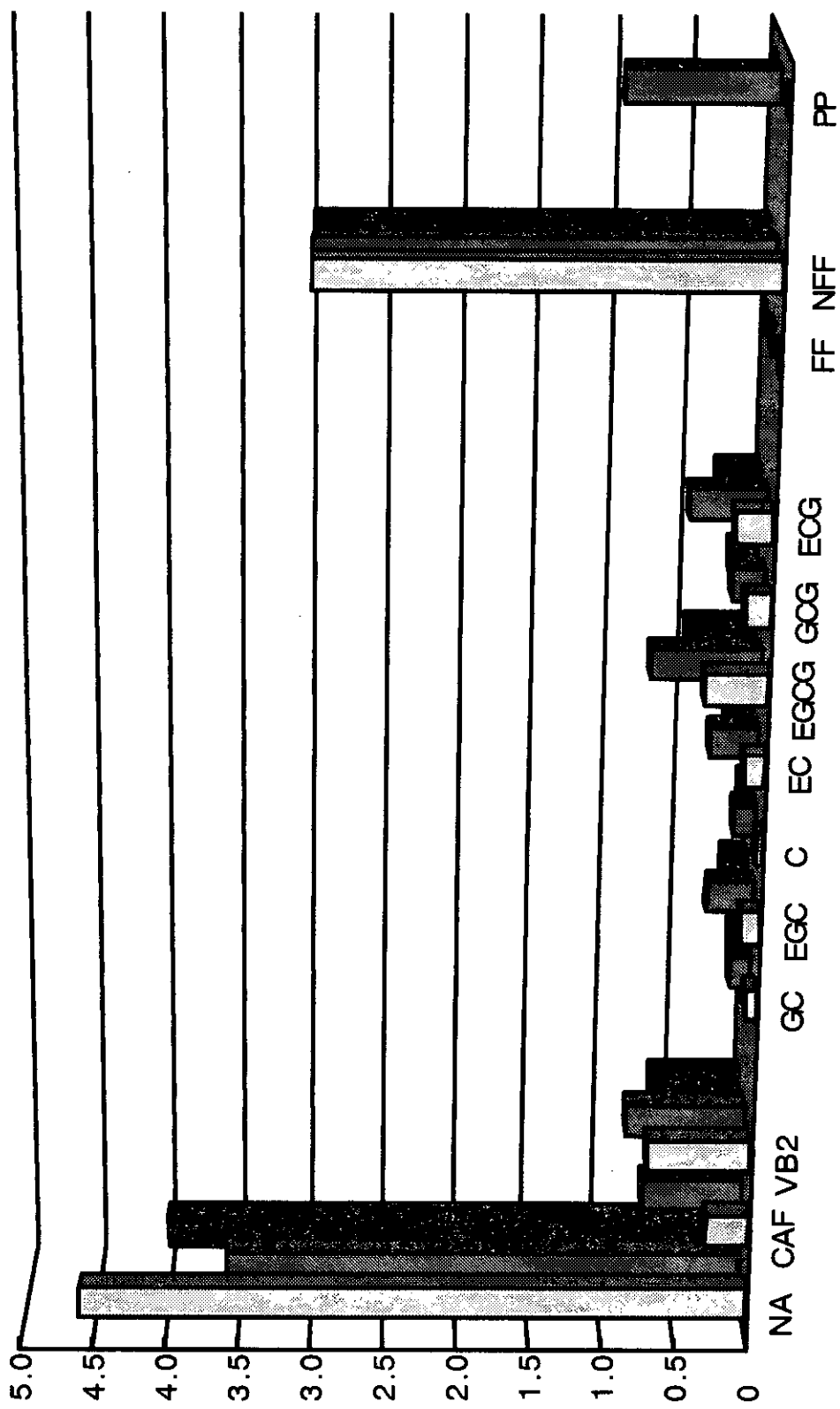


Fig. 4 Chemical content (%) in slimming pills from China

Name of slimming pills

- 杀千之素月交囊
- ▨ 茶素减肥
- 御芝堂减肥月交囊

NA: nicotinamide, CAF: caffeine, VB2: riboflavine
 GC: gallicocatechin, EGC: epigallocatechin, C: catechin,
 EC: epicatechin, ECG: epigallocatechingallate,,
 GCG: gallicocatechingallate ECG: epicatechingallate
 FF: fenfluramine, NFF: nitrosfenfluramine, PP: Phenolphthalein